

COPIA OFICIAL
CONVENIO DE PARIS
-Lisboa 1958-

05/99/26238

REPUBLICA



ARGENTINA

0599/26238

*Ministerio de Economía
y Obras y Servicios Públicos
Instituto Nacional de la Propiedad Industrial*

REC'D 28 DEC 1999

WIPO

PCT

CERTIFICADO DE DEPOSITO

Acta N° P 98 01 05609

4

El Comisario de la Administración Nacional de Patentes, certifica que con
fecha 06 de NOVIEMBRE de 19 98 se presentó a nombre de BIO SIDUS S.A.
CON DOMICILIO EN BUENOS AIRES - REPUBLICA ARGENTINA.

una solicitud de Patente de Invención relativa a "CONSTRUCCIONES GENETICAS,
METODOS DE CLONADO DEL GEN CODIFICANTE PARA ERITROPOYETINA HUMANA RE-
COMBINANTE, SELECCION DE LINEAS CELULARES PRODUCTORAS Y CULTIVO DE
CELULAS PARA LA PRODUCCION MASIVA DE ERITROPOYETINA HUMANA RECOMBINAN-
TE"

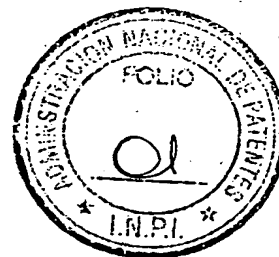
cuya descripción y dibujos adjuntos son copia fiel de la documentación depositada en el
Instituto Nacional de la Propiedad Industrial.

Se certifica que lo anexado a continuación en VEINTICUATRO fojas es copia fiel de los
registros de la Administración Nacional de Patentes de la República Argentina de los
documentos de la solicitud de Patentes de Invención precedentemente identificada.

A PEDIDO DEL SOLICITANTE Y DE CONFORMIDAD CON LO ESTABLECIDO EN
LA CONVENCION DE PARIS (LISBOA 1958), APROBADO POR LEY 17.011, EXPIDO LA
PRESENTE CONSTANCIA DE DEPOSITO EN BUENOS AIRES, REPUBLICA ARGENTINA, a
los DOS días del mes de JUNIO de 1999.

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

Ing. GERARDO P. BELLOTTI
Comisario
Adm. Nacional de Patentes



Memoria Descriptiva de la Patente de Invención

Sobre

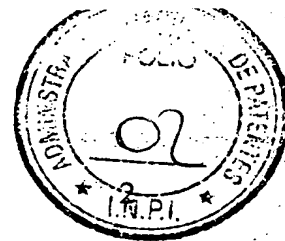
Construcciones genéticas, métodos de clonado del gen codificante para Eritropoyetina Humana Recombinante, selección de líneas celulares productoras y cultivos de células para la producción masiva de Eritropoyetina Humana Recombinante.

Solicitada por
Bio Sidus S.A.

Por el plazo de 20 años



Constitución 4234 - 1254
Buenos Aires - Argentina



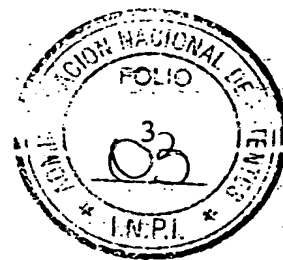
LA PRESENTE PATENTE DE INVENCION SE REFIERE A CONSTRUCCIONES GENÉTICAS, MÉTODOS DE CLONADO DEL GEN CODIFICANTE PARA ERITROPOYETINA HUMANA RECOMBINANTE, SELECCIÓN DE LÍNEAS CELULARES PRODUCTORAS Y CULTIVO DE CÉLULAS PARA LA PRODUCCIÓN MASIVA DE ERITROPOYETINA HUMANA RECOMBINANTE

La invención se refiere a un gen que codifica para eritropoyetina humana (EPO) y a su clonado en plásmidos apropiados para la transfección de células de mamífero, y a la selección de líneas productoras y su cultivo, consiguiéndose con los elementos y procesos aquí descriptos producir cantidades inesperadamente altas de EPO.

El ADN genómico que lleva a la producción de EPO ha sido en esta invención reducido a su mínima expresión, incluyendo únicamente secuencias codificantes y los intrones abarcados por estas más unas pocas bases a 3' del codon de "stop", y excluyendo cualquier secuencia homóloga, regulatoria o no, a 5' del ATG inicial. Las secuencias que aquí se excluyen son consideradas en algunos antecedentes como muy importantes para obtener mejor productividad de la proteína.

Los vectores utilizados, en contraste con los descriptos hasta el momento para la producción masiva de EPO, tienen elementos genéticos de control de la expresión sumamente simples y que permiten además una doble selección de las células recombinantes: con antibióticos y con metotrexato.

Estas construcciones genéticas tan elementales llevan inesperadamente a la producción por parte de las células transfectadas con ellas, y tratadas según el método descripto en esta patente, a cantidades asombrosamente altas de EPO por mL de medio de cultivo por día, varias veces superiores a los descriptos en patentes y publicaciones anteriores.



Novedad del invento - objeto de la patente

Las construcciones genéticas descriptas hasta el presente para producción de EPO utilizan invariablemente elementos homólogos ubicados a 5' del primer codon ATG traducido, en muchos casos explicando que esta presencia de múltiples elementos de control favorece notablemente la expresión.

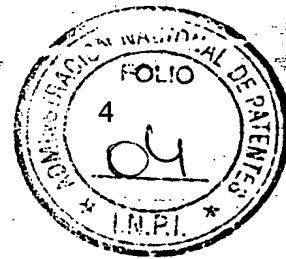
El ADN genómico utilizado en la presente patente de invención para producir EPO fue aislado en modo de prescindir de cualquier elemento genético homólogo ubicado a 5' del primer codon ATG traducido, para permitir que los elementos genéticos de control de la expresión que se encuentran en los plásmidos utilizados funcionen en modo similar a como lo hacen naturalmente, es decir actuando directamente sobre un gen codificante, sin secuencias extrañas intervinientes entre este gen y las propias secuencias de control.

Se consigue entonces que la combinación de elementos de control y el gen codificante para EPO objeto de esta patente funcione con alta eficiencia, logrando altas expresiones, comparables e incluso superiores a las reportadas usando construcciones genéticas mucho más complejas y difíciles de manejar.

Adicionalmente, la cotransfección con los dos vectores descriptos en la presente patente, que confieren resistencias diferentes, facilita la selección, amplificación genética y mantenimiento de las células productoras cotransfectadas.

EJEMPLO 1

Para obtener las construcciones genéticas se procedió como sigue:



A. Preparación de ADN genómico humano

Se extrajeron 10 ml de sangre en 10 mM EDTA pH 8 de un individuo adulto de sexo masculino y clínicamente sano. Se transfirió en alícuotas de 5 ml a dos tubos de 50 ml y se agregaron, en cada uno, 45 ml de una solución de 0,3 M sacarosa, 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 5 mM $MgCl_2$ y 1 % Tritón X 100, mantenida a 4°C.

Se dejó reposar en hielo por 10 minutos y se centrifugó 10 minutos a 1000 g y 4 °C, se descartó el sobrenadante y el *pellet* se lavó varias veces con una solución 0,075 M NaCl y 0,025 M EDTA pH 8, centrifugando cada vez 10 minutos a 1000 g y 4 °C.

Se resuspendió en 3 ml de una solución 10 mM Tris-HCl pH 8, 400 mM NaCl, 2 mM EDTA pH 8; se agregaron entonces 200 μ l de 10 % SDS (dodecilsulfato de sodio) y 500 μ l de proteinasa K (1 mg/ml en 1% SDS y 2 mM EDTA pH 8), y se incubó durante una noche a 37 °C.

Luego de esta incubación, se agregó 1 ml de solución saturada de NaCl y luego de agitar se centrifugó a 2500 g por 15 minutos.

Se transfirió el sobrenadante a un tubo de 15 ml donde se duplicó el volumen mediante el agregado de isopropanol. Se mezcló suavemente por inversión del tubo y se dejó a temperatura ambiente hasta que se formó un precipitado de ADN que fue "pescado" con una pipeta Pasteur de vidrio doblada.

Se colocó el ADN en un tubo de 2 mL y se agregó 1 mL de etanol 70 %, se dejó



durante un minuto, y luego se descartó el sobrenadante, se dejó secar el precipitado para disolverlo luego en 500 µl de TE (10 mM Tris-HCl pH 8 - 1 mM EDTA).

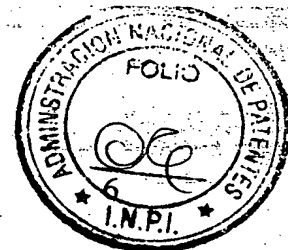
Se calculó la concentración de la solución de ADN midiendo a 260 nm la absorbancia de una dilución 1:1000 de esta solución; por cada unidad de densidad óptica se consideró tener 50 µg de ADN genómico. Conocida la concentración se preparó una solución con 500 ng de ADN genómico/µl en TE.

B. Preparación del gen codificante para EPO, apropiado para su expresión

Se preparó el gen de la EPO a partir de 500 ng del ADN genómico humano obtenido en A, con 400 ng de cada uno de los *primers* EPO 1 y EPO 2; en una solución acuosa 2,5 mM en cada deoxinucleótido (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), con 2,5 unidades de Taq ADN polimerasa (Perkin-Elmer) en un volumen final de 100 µl, utilizando el buffer recomendado por el fabricante. Se utilizó un equipo *Thermal Cycler 480* de Perkin Elmer - Cetus que se programó para 30 ciclos de: 1 minuto a 93 °C, 1 minuto a 55 °C y 3 minutos a 72 °C. De la reacción se obtuvo un fragmento de aproximadamente 2170 bases conteniendo el gen de EPO.

La secuencia de los oligonucleótidos empleados fue :

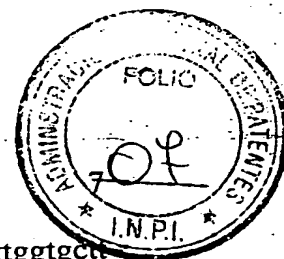
EPO 1 : 5' GAATTCTCGAGATGGGGGTGCACGGTGAG 3' que corresponde a las primeras bases que son traducidas del gen de la EPO con el agregado en su extremo 5' de un sitio de reconocimiento para la enzima Xho I y uno para Eco RI, que son utilizados en los clonados posteriores.



EPO 2 : 5' AAGCTTGGACACACCTGGTCATCTG 3', que es complementario a las últimas bases traducidas y a algunas de la parte 3' no codificante del gen de la EPO, tiene agregado en su extremo 3' un sitio de reconocimiento para la enzima Hind III para ser usado en clonados posteriores.

La secuencia obtenida es la siguiente:

gaattctcgagatgggggtgcacggtgagtactcgcgggctggggcgctcccgccgcccgggtccctgtttgagcggg
gatttagcggccggctattggccaggaggtggctgggttcaaggaccggcgacttgtaaggacccccgaagggggagg
gggggtggggcagcctccacgtgccagcggggacttgggggagtccttggggatggcaaaaacctgacctgtgaaggggac
acagtttgggggttgaggggaagaaggttgggggttctgctgtgccagtggagaggaagctgataagctgataacctgggcgct
ggagccaccacttatctgccagaggggaagcctctgtcacaccaggatgaagttggccggagaagtgatgctgtagctggg
ggtgggggtgtgcacacggcagcaggattgaatgaaggccaggaggcagcacctgagtgcttgcattggggacaggaag
gacgagctggggcagagacgtggggatgaaggaagctgtccttcacagccacccttctccctcccgctgactctcagcctgg
ctatctgttctagaatgtcctgcctggctgtggcttctcctgtcctgtcgtcctccttgggcctccagtcctgggcgccccacc
acgcctcatctgtgacagccgagtcctggagaggtacctcttgaggccaaggaggccgagaatatcacggtgagacccttccc
cagcacattccacagaactcacgctcagggttcagggaactcctccagatccaggaacctggcacttgggttgggggtggagttg
ggaagctagacactgccccctacataagaataagctgtggtggcccaaaccatacctggaaactaggcaaggagcaaagccag
cagatcctacggcctgtggggcaggggccagagccttcagggacccttgactccccgggctgtgtgcatttcagacgggctgtgct
gaacactgcagcttgaatgagaatatcactgtcccagacaccaaagtttaatttctatgcctggaagaggatggaggtgagttcctttt
tttttttcttcttttggagaatctcatttgcgagcctgatttggatgaaagggagaatgatcgggggaaaggtaaaatggagcag
cagagatgagggtgcctgggcgcagaggctcacgtctataatcccaggctgagatggccgagatgggagaattgcttgagccct
ggagtttcagaccaacctaggcagcatagttagatccccatctctacaaacatttaaaaaaattagtcaggtgaagtgtgcatgg
tggtagtcccagatatttgaaggctgaggcgggaggatcgcttgagcccaggaatttgaggctgcagtgcgtgtgatcacacc
actgcactccagcctcagtgcagagtgaggccctgtctcaaaaaagaaaagaaaaaataatgagggtgtatggaata



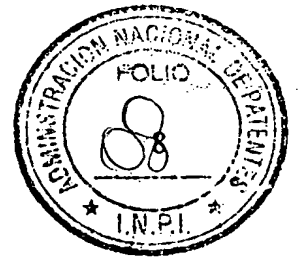
cattcattattcattcactcactcactcattcattcattcattcattcaacaagtcttattgcataccttctgttgctcagcttggtgctt
ggggctgctgaggggcaggagggagaggggtgacatgggtcagctgactcccagagtccactccctgtaggtcgggcagcagg
ccgtagaagtctggcagggcctggccctgctgtcgaagctgtcctgcggggccaggccctgttggtcaactcttcccagccgtg
ggagcccctgcagctgcatgtggataaagccgtcagtgcccttcgcagcctcaccactctgcttcgggctctgggagcccaggtg
agtaggagcggacacttctgcttgcccttctgtaagaaggggagaagggctctgctaaggagtacaggaactgtccgtattccttc
ccttctgtggcactgcagcgacctcctgttttctccttggcagaaggaagccatctcccctccagatgcggcctcagctgctccact
ccgaacaatcactgctgacactttccgaaactcttccgagtctactccaatttcctccggggaaagctgaagctgtacacagggga
ggcctgcaggacaggggacagatgaccaggtgtgtccaagctt

El primer codon traducido atg, así como el codon de "stop" tga están subrayados.

Las secuencias de sitios de restricción

C. Clonado y secuenciación

El fragmento de aproximadamente 2170 bases correspondiente al gen de la EPO, fue purificado, hechos sus extremos romos por tratamiento con el fragmento de Klenow de la ADN polimerasa y clonado en el sitio Sma I de un vector M13mp18 siguiendo técnicas estándar aplicadas en biología molecular. Los plásmidos recombinantes obtenidos se cortaron con las enzimas Xho I e Hind III, se comprobó la presencia del inserto por electroforesis del producto de los cortes de restricción en un gel 0,8 % de agarosa revelado por tinción con bromuro de etidio. Se eligió un clon positivo (dos bandas, una de alrededor de 2200 pares de bases y otra correspondiente al vector linearizado) y secuenció siguiendo la técnica de Sanger en forma manual utilizando "T7 sequencing kit" (Pharmacia) y con el uso de un secuenciador automático 370 A de Applied Biosystems International, siguiendo para cada sistema de secuenciación los protocolos recomendados por los fabricantes.



D. Vectores pVex 1 y pDHFR

Vector pVex 1

Se construyó siguiendo las técnicas usuales de biología molecular. Consiste en:

- a) fragmentos del vector bacteriano pBR322, que aportan un origen de replicación bacteriana y resistencia a ampicilina, para amplificación y selección del vector en *E. coli*.
- b) inmediatamente a 3' de a) sigue el promotor temprano de virus SV40, permite conseguir expresión de los genes clonados a 5' de este elemento.
- c) inmediatamente a 3' de b) siguen sitios de clonado Xho I e Hind III, para insertar los genes a expresar.
- d) inmediatamente a 3' de c) sigue la señal de poliadenilación de virus SV40, para obtener la correcta poliadenilación de los transcritos específicos del gen clonado en c).
- e) inmediatamente a 3' de d) siguen el promotor TK y el gen codificante de neomicina fosfotransferasa más señal de poliadenilación, para permitir seleccionar las células establemente transfectadas mediante selección por resistencia a la neomicina y antibióticos derivados de ésta como la geneticina. El extremo 3' de e) está ligado al extremo 5' de a).

Vector p DHFR

El vector pDHFR confiere resistencia a ampicilina para su selección en bacterias e incluye el ADN copia codificante para dehidrofolatoredutasa (DHFR) de ratón, cuya expresión está controlada por el promotor temprano de virus SV40 y su señal de poliadenilación.

La coexpresión de DHFR y el gen codificante para EPO permite, mediante la selección con agregado de metotrexate (MTX) en el medio de cultivo, amplificar un cierto número de veces



la expresión de EPO lograda con el vector pVex 1-EPO.

E. Clonado del gen codificante para EPO en vector de expresión

El gen secuenciado fue extraído escindiéndolo con las enzimas Xho I - Hind III del vector en el que se lo clonó en C. Fue entonces aislado y clonado en los mismos sitios de restricción del vector pVex I. Se aisló un clon positivo pVex-EPO.

Todas estas operaciones se llevaron a cabo siguiendo las técnicas tradicionales de ingeniería genética.

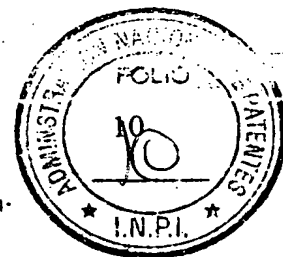
F. Cotransfección y amplificación con MTX

Se utilizó una línea celular CHO (*Chinese Hamster Ovary*), de ovario de hamster, mutada para ser deficiente en el gen de la enzima DHFR (CHO-DHFR⁻), en modo de facilitar la amplificación genética con MTX.

Durante todo el proceso las células se crecieron a 37 °C en una atmósfera con 5 % de CO₂.

Se cotransfectaron células CHO, para ello se siguió la técnica del fosfato de calcio que, para una caja de Petri de 90 mm de diámetro, consiste en :

- Cambiar el medio de cultivo, que es alfa-MEM adicionado con 10 % de suero fetal bovino, por medio fresco 4-8 horas antes de la transfección.
- Agregar a un tubo de 5 ml, 500 µl de una solución 10 gr/l HEPES de pH 7,1; 16 gr/l



NaCl y 10 μ l de una solución 35 mM de Na_2HPO_4 y 35 mM de NaH_2PO_4 .

- Preparar en otro tubo de 1,5 ml una solución con 60 μ l de 2 M CaCl_2 y 10 μ g de cada ADN a transfectar (pVex-EPO y pDHFR), llevando a 500 μ l con H_2O . El plásmido pDHFR que se describe en el ejemplo 2 está basado en pBR 322, confiere resistencia a ampicilina, puede replicarse en *E. coli*, tiene clonado el gen de DHFR entre el promotor temprano y el terminador de SV40, y permite la expresión de la proteína DHFR en las células CHO. Esta proteína confiere resistencia a Metotrexato, el que puede ser usado entonces para seleccionar células que poseen alta productividad de Eritropoyetina.

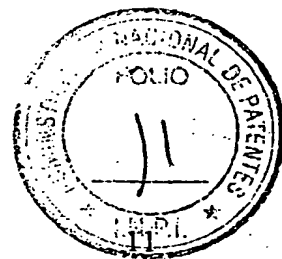
- Agregar al tubo con Hepes la solución de ADN y CaCl_2 gota a gota mientras se burbujea aire para conseguir un mezclado veloz y que las concentraciones locales sean lo más pequeñas posibles, lo que posibilita la formación de un precipitado muy fino que es incorporado más eficientemente por las células.

- Dejar reposar 30 minutos y luego verter sobre las células.

- Distribuir bien, agitando suavemente, y dejar toda la noche en incubador a 37°C en atmósfera de CO_2 5%.

- Lavar 2 veces con PBS (8 gr NaCl, 0,2 gr KCl, 1,44 gr Na_2HPO_4 , 0,24 gr NaH_2PO_4 , llevado a 1 litro con H_2O y a pH 7,4 con HCl y agregar medio de cultivo fresco.

Veinticuatro horas después de la transfección se comenzó a seleccionar con genética



(G 418) en una concentración final de 600 $\mu\text{g/ml}$. Las células que incorporaron establemente el plásmido pVex-EPO fueron capaces de resistir el antibiótico mientras todas las demás habían muerto al cabo de 25 días. Se separaron colonias resistentes y se ensayó su productividad.

Una vez aislados los clones se eligieron los tres de mejor productividad.

Aprovechando las construcciones genéticas utilizadas en la invención se hizo con cada uno de los tres clones una selección con un segundo agente selectivo: MTX a diferentes concentraciones : 10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M. Para ello se cambió el medio de cultivo a alfa-MEM sin nucleósidos, suplementado con 10 % de suero fetal bovino dializado. Es un factor crítico que la diálisis se lleve a cabo según el siguiente esquema: para 100 ml de suero se coloca el suero en una bolsa de diálisis de porosidad menor a 3000 Da (una porosidad mayor haría perder factores de crecimiento con lo cual las células no podrían crecer y reproducirse), se cierra la bolsa herméticamente y se sumerge completamente en un recipiente con 5 litros de agua bidestilada, se deja a 4 °C durante 12 horas; a las 12 horas se descarta el agua y se agregan otros 5 litros; se deja otras 12 horas a 4 °C y luego se saca la bolsa de diálisis y se recupera el suero. Dializar durante períodos más cortos, o en volúmenes más pequeños, o sin cambiar el agua no serviría, ya que una pequeña proporción de nucleótidos podría quedar en el suero, con lo que la selección con MTX no funcionaría. Dializar por períodos más largos tampoco serviría ya que algunas proteínas, necesarias para el crecimiento de las células podrían precipitar y perderse.

G. Aislamiento de líneas de producción masiva

Los clones que crecieron en 10^{-7} M y 10^{-6} M de MTX fueron aislados, amplificados en medio fresco alfa-MEM sin nucleósidos suplementado con 10 % de suero fetal bovino dializado. Una vez crecidos se ensayó el sobrenadante de cultivo para medir la producción y secreción de EPO. Para ello, se usó un inmunoensayo específico.

El proceso descrito anteriormente concluyó con la selección de un clon de células recombinantes que producía 50.000 μ g de eritropoyetina/litro de medio de cultivo/día.

Para comprobar que no existiesen errores en la secuencia del gen utilizado o en su transcripción, se controlaron los transcriptos celulares específicos de EPO como se describe en H.

Para estudiar la calidad de la proteína obtenida se procedió como se describe en I.

H) Verificación de la secuencia del ARNm mensajero específico producido por las células recombinantes.

1. Preparación de ARN de células

Se preparó ARN total a partir de una de las líneas productoras según el siguiente protocolo:

- Se lavó 2 veces con 10 ml de PBS una caja de Petri de 90 mm de diámetro con



células confluentes.

- Se agregaron 2 ml de *buffer* GTC, distribuyéndolo por toda la placa.

Composición *buffer* GTC

50 gr de tiocianato de guanidinio

0,5 gr de N-Lauroilsarcosina

2,5 ml de citrato de sodio 1 M pH 7

0,7 ml de β -mercaptoetanol

0,33 ml de 30 % antiespuma (SIGMA)

H₂O c.s.p. 100 ml, pH 7.0

Las células se lisaron y quedó una solución altamente viscosa. Se transfirió la solución a un tubo de 15 ml, y se repitió la operación con otros 2 ml de *buffer* GTC.

- Se agitó el tubo energicamente, durante 1 minuto, para romper el ADN. Se realizó un fraccionamiento en gradiente de cloruro de cesio. Para ello, se colocó en un tubo de ultracentrifuga, 4 ml de solución de CsCl (95,97 gr CsCl y 2,5 ml de Na Acetato 1 M pH 5,4 llevado todo a 100 ml con H₂O). Sobre éste y sin mezclar, se agregó la suspensión de las células en GTC, llenando el tubo con *buffer* GTC y ultracentrifugando a 20 °C, 20 horas a 31000 rpm.

- En estas condiciones, el ARN quedó en el fondo del tubo (*pellet*) y el ADN formó



una banda que quedó a mitad del gradiente de cloruro de cesio.

- Se descartó el sobrenadante, cuidando de eliminar todo el ADN y dejando secar el ARN, en el *pellet*, por 5 minutos.

- Se disolvió el *pellet* en 200 μ l de H_2O y se transfirió a un tubo de 1,5 ml.

- Se agregaron 200 μ l de 0,4 M Na Acetato pH 4,8 y dos volúmenes de etanol, mezclando bien y dejando 30 minutos a $-80^{\circ}C$.

- Se centrifugó en microcentrífuga a 14000 rpm por 15 minutos, descartando el sobrenadante y enjugando el precipitado con 1 ml de etanol 80 %.

- Se secó y redisolvió el *pellet* en 100 μ l de H_2O .

- Se midió la concentración de una dilución 1:100 de la solución de ARN; a 260 nm (una unidad de densidad óptica equivale a 40 μ g de ARN).

Nota : Todas las soluciones y elementos utilizados estuvieron libres de ARNasa.

2. Preparación de ADNc específico



Se preparó el ADNc específico con un kit para tal fin (cDNA Synthesis System Plus, Amersham - cat. RPN 1256) siguiendo sus instrucciones y usando el oligonucleótido EPO 2 como *primer* específico.

3. Clonado del ADNc codificante para EPO

Se amplificó 1/20 del ADNc obtenido, usando 400 ng de cada uno de los oligonucleótidos EPO 2 y EPO 3 y 2,5 mM de cada deoxinucleótido, en el *buffer* adecuado y con 2,5 Unidades de Taq ADN polimerasa, en 100 µl totales.

Se llevaron a cabo 35 ciclos de amplificación de: 1 minuto a 93 °C, 1 minuto a 55 °C y 1 minuto a 72 °C.

EPO 3 fue sintetizado como ya fue descrito para EPO 1 y EPO 2, y su secuencia (5' GAATTCCATGGGGGTGCACGAATGTCC 3') corresponde a las primeras 20 bases codificantes del ADNc de EPO, con el agregado de un sitio de reconocimiento para la enzima Eco RI, para facilitar las manipulaciones genéticas posteriores.

Se obtuvo un fragmento de aproximadamente 600 pares de bases, que fue clonado en vectores M13mp18 y M13mp19.

Se ensayó la presencia del inserto en los clones con cortes de restricción y se secuenció



en ambas direcciones para conocer la secuencia completa, usando el método de Sanger.

Dada la altísima autocomplementaridad que poseen regiones del gen, lo que provoca la aparición de muchas y muy ambiguas compresiones en la radioautografía, fue necesario utilizar un kit de secuencia que utiliza Taq ADN polimerasa y bases modificadas, con lo que se obtienen resultados de menor calidad pero que eliminan las compresiones. El kit empleado fue el *Gene aTaq* de Pharmacia-LKB Biotechnology.

La secuenciación completa de bases del ADN copia de la eritropoyetina humana aislado y clonado mostró que codifica para EPO, por lo que no hay errores en el gen o en su transcripción.

I) Estudio de la EPO producida

La EPO obtenida cultivando las células del presente ejemplo fue llevada a pureza y luego sometida a diferentes estudios de calidad e identificatorios:

1. En un gel desnaturalizante SDS-PAGE corrió como una banda ancha de alrededor de 30 kDa de peso molecular.
2. Esa banda fue reconocida por un anticuerpo monoclonal así como por un anticuerpo policlonal contra Epo humana en un ensayo "Western blot".



3. El tratamiento con glicanasas probó la existencia de las cadenas glicosídicas en cantidad y peso molecular acorde a lo esperado.

4. La EPO producida mostró estar compuesta por una serie de especies de punto isoelectrico comprendido entre 3,0 y 4,5

5. La secuenciación completa de aminoácidos de la proteína aislada y purificada a partir del sobrenadante de cultivo de las líneas celulares transfectadas mostró total homología con la eritropoyetina humana natural que posee la siguiente secuencia de 165 aminoácidos.

NH ₂ —	Ala	Pro	Pro	Arg	Leu	Ile	Cys	Asp	Ser	Arg	Val	Leu
	Glu	Arg	Tyr	Leu	Leu	Glu	Ala	Lys	Glu	Ala	Glu	<u>Asn</u>
	Ile	Thr	Thr	Gly	Cys	Ala	Glu	Hys	Cys	Ser	Leu	Asn
	Glu	<u>Asn</u>	Ile	Thr	Val	Pro	Asp	Thr	Lys	Val	Asn	Phe
	Tyr	Ala	Trp	Lys	Arg	Met	Glu	Val	Gly	Gln	Gln	Ala
	Val	Glu	Val	Trp	Gln	Gly	Leu	Ala	Leu	Leu	Ser	Glu



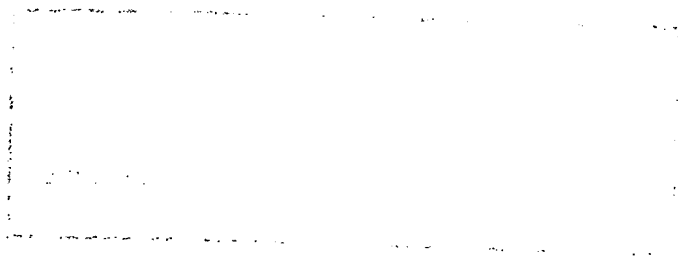
Ala	Val	Leu	Arg	Gly	Gln	Ala	Leu	Leu	Val	<u>Asn</u>	Ser
Ser	Gln	Pro	Trp	Glu	Pro	Leu	Gln	Leu	Hys	Val	Asp
Lys	Ala	Val	Ser	Gly	Leu	Arg	Ser	Leu	Thr	Thr	Leu
Leu	Arg	Ala	Leu	Gly	Ala	Gln	Lys	Glu	Ala	Ile	Ser
Pro	Pro	Asp	Ala	Ala	<u>Ser</u>	Ala	Ala	Pro	Leu	Arg	Thr
Ile	Thr	Ala	Asp	Thr	Phe	Arg	Lys	Leu	Phe	Arg	Val
Tyr	Ser	Asn	Phe	Leu	Arg	Gly	Lys	Leu	Lys	Leu	Tyr
Thr	Gly	Glu	Ala	Cys	Arg	Thr	Gly	Asp	— COOH		

X sitios de glicosilación

6. La presencia de los cuatro sitios de glicosilación sobre la cadena de 165 aminoácidos así como la estructura de hidratos de carbono, fundamentalmente los residuos de ácido siálico terminales, fueron demostrados conjuntamente con su correcta actividad biológica *in vivo*, en el modelo de ensayo del ratón policitémico ex-hipóxico, exhibiendo total paralelismo frente al estándar internacional correspondiente.



La productividad alcanzada medida por un inmunoensayo específico fue de 50 mg/litro de cultivo/día





20

REIVINDICACIONES

Habiendo descripto y ejemplificado la naturaleza y objeto principal de la presente invención, así como también la manera en que la misma se puede llevar a la práctica. Se declara reivindicar como de propiedad y de derechos exclusivos:

1) CONSTRUCCIONES GENÉTICAS, MÉTODOS DE CLONADO DEL GEN CODIFICANTE PARA ERITROPOYETINA HUMANA RECOMBINANTE, SELECCIÓN DE LÍNEAS CELULARES PRODUCTORAS Y CULTIVO DE CÉLULAS PARA LA PRODUCCIÓN MASIVA DE ERITROPOYETINA HUMANA RECOMBINANTE **caracterizadas porque:** a) las construcciones genéticas utilizan sólo la parte codificante del gen humano de EPO, sin la inclusión de elementos genéticos homólogos ubicados a 5' del primer codon ATG traducido b) las construcciones genéticas poseen, como sistemas de control de la expresión, promotores y terminadores virales, c) el método de clonado del gen codificante utiliza directamente ADN genómico, d) las líneas celulares se seleccionan utilizando un doble sistema, I) resistencia a geneticina y II) resistencia a cantidades crecientes de Metotrexato y, e) la productividad de EPO de las células seleccionadas es mayor a 50 mg/litro de medio de cultivo/día.

La secuencia utilizada es:

gaattctcgagatgggggtgcacggtgagtactcgcgggctgggcgctcccgccgcccgggtccctgtttgagcggg
gatttagcggcccggtattggccaggaggtggctgggttcaaggaccggcgacttgtcaaggaccccggaagggggagg



21

ggggtggggcagcctccacgtgccagcggggacttgggggagtccttggggatggcaaaa acctgacctgtgaaggggac
acagtttgggggttgaggggaagaaggtttgggggttctgctgtgccagtggagaggaagctgataagctgataacctggg
cgctggagccaccacttatctgccagaggggaagcctctgtcacaccaggattgaagtttggccggagaagtggatgctggt
agctgggggtgggggtgtgcacacggcagcaggattgaatgaaggccaggaggagcagcacctgagtgttgcattggttg
ggacaggaaggacgagctggggcagagacgtggggatgaaggaaagctgtccttccacagccacccttctccctccccgcc
tgactctcagcctggctatctgttctagaatgtcctgcttggctgtggcttctcctgtccctgctgtcgtccctctgggctccca
gtcctgggcgccccaccacgcctcatctgtgacagccgagtcctggagaggtacctcttgaggccaaggaggccgagaa
tatcacggtgagacccttccccagcacattccacagaactcacgctcagggttcagggaactcctccagatccaggaaac
ctggcacttggttgggggtggagttgggaagctagacactgccccctacataagaataagtctggtggcccaaaccataacc
tggaaactaggcaaggagcaaagccagcagatcctacggcctgtggggccaggggccagagccttcagggaacccttgactcc
ccgggctgtgtgcatttcagacgggctgtgtgaacactgcagcttgaatgagaatatcactgtcccagacaccaaagttaatt
tctatgcctggaagaggatggaggtgagttccttttttttttttcttttggagaatctcatttgcgagcctgat
tttggatgaaagggagaatgatcgggggaaaggtaaaatggagcagcagagatgaggctgcctgggcgagaggctcac
gtctataatcccaggctgagatggccgagatgggagaattgcttgagccctggagtttcagaccaacctaggcagcatagt
agatcccccatctctacaaacatttaaaaaaattagtcaggtgaagtgggtgcatggtggtagtccagatatttgaaggctga
ggcgggaggatcgcttgagcccaggaatttgggctgcagtgcagctgtgatcacaccactgcactccagcctcagtgcag
agtgaggccctgtctcaaaaaagaaaaagaaaaataatgagggtgtatggaatacattcatttattcactcact
cactcactcattcattcattcattcaacaagtcttattgcataccttctgtttgctcagcttgggtgcttggggctgtgagggg
caggaggagagggtgacatgggtcagctgactcccagagtcactccctgtagggtcgggcagcaggccgtagaagtctg
gcagggcctggccctgctgtcggaagctgtcctgcggggccaggccctgttggtcaactcttcccagccgtgggagccct
gcagctgcatgtggataaagccgtcagtgcccttcgcagcctcaccactctgcttcgggctctgggagcccaggtgagtagg
agcggacacttctgcttgcctttctgtaagaaggggagaagggtcttctaaggagtacaggaactgtccgtattccttccct
tctgtggcactgcagcagcctcctgttttctccttggcagaaggaaagccatctccctccagatgcggcctcag



ctgctccactccgaacaatcactgctgacactttccgcaaactcttccgagctactccaatttctccggggaaagctgaagct
gtacacaggggaggcctgcaggacaggggacagatgaccaggtgtgtccaagctt

El primer codon traducido atg, así como el codon de "stop" tga están subrayados.

Las secuencias de sitios de restricción usados en los clonados se marcaron con letra negrita cursiva.

2) CONSTRUCCIONES GENETICAS, según la reivindicación 1, caracterizadas porque los sistemas genéticos de expresión consisten de dos vectores que poseen como elementos de control de la expresión sólo el promotor temprano de virus SV40 y su terminador, y que permiten llegar a producir cantidades sorprendentemente altas de EPO, mayores que 50 mg/litro de medio de cultivo/día, en células CHO cotransfectadas establemente con estos vectores y seleccionadas por su resistencia a cantidades crecientes de MTX.

3) CONSTRUCCIONES GENETICAS, según la reivindicación 1, caracterizadas porque la EPO obtenida consiste de 165 aminoácidos según la siguiente secuencia:

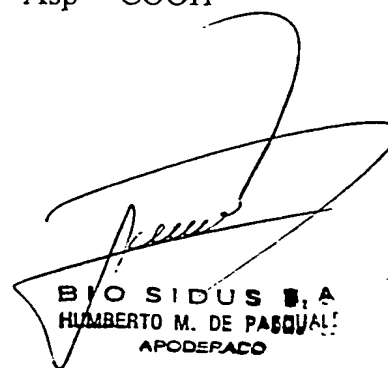
NH ₂ —	Ala	Pro	Pro	Arg	Leu	Ile	Cys	Asp	Ser	Arg	Val	Leu
	Glu	Arg	Tyr	Leu	Leu	Glu	Ala	Lys	Glu	Ala	Glu	<u>Asn</u>
	Ile	Thr	Thr	Gly	Cys	Ala	Glu	Hys	Cys	Ser	Leu	Asn



23

Glu	<u>Asn</u>	Ile	Thr	Val	Pro	Asp	Thr	Lys	Val	Asn	Phe
Tyr	Ala	Trp	Lys	Arg	Met	Glu	Val	Gly	Gln	Gln	Ala
Val	Glu	Val	Trp	Gln	Gly	Leu	Ala	Leu	Leu	Ser	Glu
Ala	Val	Leu	Arg	Gly	Gln	Ala	Leu	Leu	Val	<u>Asn</u>	Ser
Ser	Gln	Pro	Trp	Glu	Pro	Leu	Gln	Leu	Hys	Val	Asp
Lys	Ala	Val	Ser	Gly	Leu	Arg	Ser	Leu	Thr	Thr	Leu
Leu	Arg	Ala	Leu	Gly	Ala	Gln	Lys	Glu	Ala	Ile	Ser
Pro	Pro	Asp	Ala	Ala	<u>Ser</u>	Ala	Ala	Pro	Leu	Arg	Thr
Ile	Thr	Ala	Asp	Thr	Phe	Arg	Lys	Leu	Phe	Arg	Val
Tyr	Ser	Asn	Phe	Leu	Arg	Gly	Lys	Leu	Lys	Leu	Tyr
Thr	Gly	Glu	Ala	Cys	Arg	Thr	Gly	Asp	— COOH		

X sitios de glicosilación


BIO SIDUS S.A.
HUMBERTO M. DE PASQUAL
APODERADO



RESUMEN

El gen codificante para eritropoyetina humana (EPO) se obtuvo a partir de ADN genómico humano. Este gen no incluye elementos genéticos homólogos ubicados a 5' del primer codon ATG traducido. Se clonó en un vector de expresión para células eucarióticas. Se cotransfectaron células de ovario de hámster (CHO) con este vector y otro plásmido de expresión para dehidrofolatoreductasa (DHFR). Ambos plásmidos tienen como únicos elementos de control de la expresión al promotor temprano de virus SV40 y su señal de poliadenilación. Este sistema permite efectuar una doble selección de las células recombinantes, ya que confieren resistencia a geneticina y a metotrexate (MTX). Una vez efectuada la selección se efectuó la amplificación genética con MTX. Con un inmunoensayo específico para EPO se efectuó el testeo de la capacidad productiva de las células recombinantes elegidas.

THIS PAGE BLANK (USPTO)